



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Metabolitos secundarios exudados por raíces de
plantas de Estrategia I en respuesta a la deficiencia de
hierro: caracterización, transporte y función

Patricia Sisó Terraza

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Ciència i Tecnologia Agrària i Alimentària

Directores

Dra. Ana María Álvarez Fernández

Dra. Anunciación Abadía Bayona

Tutor

Dr. Tomás Casero Mazo

2017

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI

Departamento de Nutrición Vegetal

Grupo de Fisiología de Estrés Abiótico en Plantas



CSIC



Plant Stress Physiology

TESIS DOCTORAL:

Metabolitos secundarios exudados por raíces de plantas de Estrategia I en respuesta a la deficiencia de hierro: caracterización, transporte y función

Memoria presentada por **Patricia Sisó Terraza**, Ingeniero Agrónomo, para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

Dña. Patricia Sisó Terraza

Lleida, abril de 2017

Esta Tesis Doctoral ha sido escrita en la modalidad de compendio de trabajos previamente publicados y consta de las siguientes publicaciones:

1. Fourcroy Pierre*, **Sisó-Terraza Patricia***, Sudre Damien*, Savirón María, Reyt Guilhem, Gaymard Frédéric, Abadía Anunciación, Abadía Javier, Álvarez-Fernández Ana, Briat Jean-François (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytologist* 201: 155. ([doi:10.1111/nph.12471](https://doi.org/10.1111/nph.12471))^{Q1}
2. **Sisó-Terraza Patricia***, Luis-Villarroya Adrián*, Fourcroy Pierre, Briat Jean-François, Abadía Anunciación, Gaymard Frédéric, Abadía Javier, Álvarez-Fernández Ana (2016) Accumulation and secretion of coumarinolignans and other coumarins in *Arabidopsis thaliana* roots in response to iron deficiency at high pH. *Frontiers in Plant Science* 7: 1711. ([doi:10.3389/fpls.2016.01711](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01711))^{Q1}
3. **Sisó-Terraza Patricia**, Ríos Juan José, Abadía Javier, Abadía Anunciación, Álvarez-Fernández Ana (2016) Flavins secreted by roots of iron-deficient *Beta vulgaris* enable mining of ferric oxide via reductive mechanisms. *New Phytologist* 209: 733. ([doi:10.1111/nph.13633](https://doi.org/10.1111/nph.13633))^{Q1}



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

La Dra. ANA MARÍA ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, Científico Titular del CSIC, y la Dra. ANUNCIACIÓN ABADÍA BAYONA, Profesor de Investigación del CSIC,

AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“METABOLITOS SECUNDARIOS EXUDADOS POR RAÍCES DE PLANTAS DE ESTRATEGIA I EN RESPUESTA A LA DEFICIENCIA DE HIERRO: CARACTERIZACIÓN, TRANSPORTE Y FUNCIÓN”**, realizada por el Ingeniero Agrónomo PATRICIA SISÓ TERRAZA, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Lleida, y certifican que ha sido realizada bajo su dirección en la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para que conste a los efectos oportunos expiden la presente autorización

En Zaragoza, abril de 2017

Fdo. Ana María Álvarez Fernández

Fdo. Anunciación Abadía Bayona

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR ACADÉMICO PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

El Dr. TOMÁS CASERO MAZO, Profesor Titular de Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de la Universitat de Lleida

AUTORIZA

La presentación de la siguiente memoria de Tesis Doctoral, titulada **“METABOLITOS SECUNDARIOS EXUDADOS POR RAÍCES DE PLANTAS DE ESTRATEGIA I EN RESPUESTA A LA DEFICIENCIA DE HIERRO: CARACTERIZACIÓN, TRANSPORTE Y FUNCIÓN”** presentada por el Ingeniero Agrónomo PATRICIA SISÓ TERRAZA, para optar al grado de Doctor por la Universitat de Lleida.

Y para que conste a los efectos oportunos expide la presente autorización

En Lleida, abril de 2017

Fdo. Tomás Casero Mazo

Financiación

Los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido financiados por los proyectos de investigación AGL2010-16515, AGL2012-031988, AGL2013-42175-R, y AGL2016-75226-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Grupo Consolidado A03 de la DGA. La Tesis de Patricia Sisó Terraza ha sido financiada por una beca-contrato FPI del MINECO.

Funding

The studies included in this PhD-Thesis were supported by the Spanish MINECO (AGL2010-16515, AGL2012-031988, AGL2013-42175-R, and AGL2016-75226-R) and the Aragón Government (group A03). Patricia Sisó Terraza was supported by a FPI-contrat fellowship from MINECO.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Pág.
Resumen/ Resum/ Summary	3
Capítulo 1. Introducción general	11
1.1. Deficiencia de Fe en plantas.....	13
1.1.1. Hierro en el suelo	14
1.1.2. Causas de la deficiencia de Fe	15
1.1.3. Mecanismos de adquisición de Fe	17
1.1.4. Formas de aliviar la deficiencia de Fe en los cultivos	18
1.2. Exudación radicular en el contexto de la deficiencia de Fe	19
1.2.1. Compuestos exudados.....	20
1.2.2. Mecanismos de exudación	33
1.2.3. Funciones de los compuestos exudados.....	37
1.3. Referencias	42
Capítulo 2. Objetivos	53
Capítulo 3. Resultados	57
3.1. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by <i>Arabidopsis</i> roots in response to iron deficiency	59
Supplementary Material Chapter 3.1	75
3.2. Accumulation and secretion of coumarinolignans and other coumarins in <i>Arabidopsis thaliana</i> roots in response to iron deficiency at high pH.....	87
Supplementary Material I Chapter 3.2.....	113
Supplementary Material II Chapter 3.2	125
3.3. Coumarin accumulation in roots of iron-deficient tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	133
3.4. Flavins secreted by roots of iron-deficient <i>Beta vulgaris</i> enable mining of ferric oxide via reductive mechanisms	161
Supplementary Material Chapter 3.4	177
Capítulo 4. Discusión general	191
Capítulo 5. Conclusiones	213
Anexo. Curriculum vitae	217

RESUMEN / RESUM / SUMMARY

Una característica metabólica importante de las raíces de las plantas es la exudación a la rizosfera de una amplia variedad de compuestos. La regulación de la síntesis y exudación activa de éstos permite que su acción se produzca en el lugar, momento y tiempo adecuados y, por consiguiente, confiere a la planta la capacidad de reaccionar ante variaciones del entorno eludiendo posibles efectos adversos, como cambios osmóticos, ataque de patógenos o escasez de nutrientes, entre otros. Parte de los compuestos exudados son producto del metabolismo secundario y ha sido muy estudiado su papel en la regulación de la comunidad microbiana del suelo, en el fomento de simbiosis beneficiosas y en la inhibición del crecimiento de plantas competidoras. Menos investigada ha sido, sin embargo, la influencia de estos compuestos en la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera. En esta Tesis Doctoral se investiga la exudación radicular de compuestos fenólicos y flavinas en respuesta a la deficiencia de hierro (Fe), micronutriente muy abundante en los suelos y generalmente poco disponible. Aunque esta respuesta se conoce desde hace décadas en especies no gramíneas, la identidad y la cantidad de compuestos exudados, los mecanismos de transporte y sus funciones en la rizosfera, son poco conocidos. Para este estudio se han utilizado la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, y dos especies de interés agronómico, tomate (*Solanum lycopersicum*) y remolacha (*Beta vulgaris* var. *saccharífera*).

El estudio constituye el primer análisis exhaustivo y simultáneo de compuestos fenólicos y flavinas acumulados en raíces y exudados al medio de cultivo como respuesta de las plantas a la deficiencia de Fe. Se aplica una aproximación analítica basada en la separación de los compuestos por cromatografía líquida de alta eficacia y su detección por la combinación de espectroscopía de fluorescencia y de ultravioleta-visible con espectrometría de masas de diferentes modalidades. En raíces de *A. thaliana* y tomate, la deficiencia de Fe induce la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos de tipo cumarina, y no afecta a la concentración de flavinas. Remolacha no responde a la deficiencia de Fe produciendo cumarinas sino que, de acuerdo a lo ya conocido, sintetiza y acumula flavinas en raíz, y las exuda al medio, principalmente como sulfatos de riboflavina. El tiempo de exposición a la deficiencia de Fe y/o el pH del medio de cultivo afecta a la producción de cumarinas en *A. thaliana* y tomate. Los perfiles de compuestos de tipo cumarina producidos por ambas especies también difieren. Aunque las dos producen cumarinas simples con las sustituciones oxigenadas -OH, -OCH₃ y -O-hexosil, el grado de oxigenación es diferente. Así, en tomate predominan las cumarinas tetra-oxigenadas como trihidroximetoxicumarina frente a las tri- y di-oxigenadas como fraxetina y escopoletina, respectivamente, mientras que en *A. thaliana* son di- y tri-oxigenadas y se producen junto con cumarinolignanos de tipo cleomiscosina. Las cumarinas se acumulan en raíz tanto en formas hexósido como aglicona, con la forma predominante dependiendo de cada cumarina y/o especie vegetal. El perfil de compuestos de tipo cumarina presentes en el medio de cultivo es diferente al observado en las raíces, presentándose en forma aglicona y siendo mayoritarias escopoletina y fraxetina. Esta exudación de cumarinas en *A. thaliana* está mediada por la proteína transportadora AtABCG37.

La retirada de las cumarinas y flavinas exudadas del medio de *A. thaliana* y de remolacha tiene un impacto negativo en la nutrición férrica de estas especies. La cumarina tipo catecol fraxetina y las flavinas en forma reducida permiten la disolución de óxido férrico -forma característica del Fe del suelo- a pHs relevantes desde el punto de vista agronómico. Además, se demuestra que las raíces de las plantas de remolacha deficientes en Fe pueden utilizar flavinas endógenas extracelulares para promover la disolución reductiva de óxidos férricos. El trabajo concluye que la exudación radicular de compuestos de tipo cumarina en plantas de *A. thaliana* y de flavinas en plantas de remolacha permite aumentar la concentración de Fe soluble en suelos con baja disponibilidad de este nutriente y, por lo tanto, mejora la nutrición férrica de estas especies.

Una característica metabòlica important de les arrels de les plantes és l'exsudació a la rizosfera d'una àmplia varietat de compostos. La regulació de la síntesi i exsudació activa d'aquests, permet que la seva acció es produeixi en el lloc, moment i temps adequats i, per tant, confereix a la planta la capacitat de reaccionar davant de variacions de l'entorn eludint possibles efectes adversos, com canvis osmòtics, atac de patògens o l'escassetat de nutrients, entre d'altres. Part dels compostos exsudats són producte del metabolisme secundari i el seu paper ha estat molt estudiat en la regulació de la comunitat microbiana del sòl, en el foment de simbiosis beneficioses i en la inhibició del creixement de plantes competidores. Menys investigada ha estat la influència d'aquests compostos en la disponibilitat de nutrients de la rizosfera. En aquesta Tesis Doctoral s'investiga l'exsudació radicular de compostos fenòlics i flavines en resposta a la deficiència de ferro (Fe), micronutrient molt abundant en els sòls i generalment poc disponible. Tot i que aquesta resposta es coneix des de fa dècades en espècies no gramínies, la identitat i la quantitat de compostos exsudats, els mecanismes de transport i les seves funcions a la rizosfera, són poc coneguts. Per aquest estudi s'ha utilitzat l'espècie model *Arabidopsis thaliana*, i dues espècies d'interès agronòmic, el tomàquet (*Solanum lycopersicum*) i la remolatxa (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*).

L'estudi constitueix el primer anàlisi exhaustiu i simultani de compostos fenòlics i flavines acumulats a les arrels i exsudats al medi de cultiu com a resposta de les plantes a la deficiència de Fe. S'aplica una aproximació analítica basada en la separació dels compostos per cromatografia líquida d'alta eficàcia i la seva detecció per la combinació d'espectroscòpia de fluorescència i d'ultravioleta-visible amb espectrometria de masses de diferents modalitats. En arrels de *A. thaliana* i tomàquet, la deficiència de Fe induïx la síntesi i acumulació de compostos fenòlics de tipus cumarina, i no afecta la concentració de flavines. La planta de remolatxa no respon a la deficiència de Fe produint cumarines sinó que, d'acord al que ja s'ha conegut, sintetitza i acumula flavines a les arrels, i les exsuda al medi, principalment com a sulfats de riboflavina. El temps d'exposició a la deficiència de Fe i/o el pH del medi de cultiu afecta la producció de cumarines en *A. thaliana* i tomàquet. Els perfils de compostos de tipus cumarina produïts per les dues espècies també difereixen. Encara que les dues produeixen cumarines simples amb les substitucions oxigenades -OH, -OCH₃ i -O-hexosil, el grau d'oxigenació és diferent. Així, en tomàquet predominen les cumarines tetra-oxigenades com trihidroximetoxicumarina enfront de les tri- i di-oxigenades com la fraxetina i l'escopoletina, respectivament, mentre que a *A. thaliana* són di- i tri-oxigenades i es produeixen conjuntament amb cumarinolignans de tipus cleomiscosina. Les cumarines s'acumulen a les arrels tant en formes de hexòsid com aglicona, amb la forma predominant depenent de cada cumarina i/o espècie vegetal. El perfil de compostos de tipus cumarina presents en el medi de cultiu és diferent a l'observat a les arrels, presentant-se en forma aglicona i sent majoritàries l'escopoletina i la fraxetina. Aquesta exsudació de cumarines en *A. thaliana* està intervinguda per la proteïna transportadora AtABCG37.

La retirada de les cumarines i flavines exsudades del mitjà de *A. thaliana* i de remolatxa té un impacte negatiu en la nutrició fèrrica d'aquestes espècies. La cumarina tipus catecol fraxetina i les flavines en forma reduïda permeten la dissolució d'òxid fèrric -forma característica del Fe als sòls- a pHs rellevants des del punt de vista agronòmic. A més, es demostra que les arrels de les plantes de remolatxa deficientes en Fe poden utilitzar les flavines endògenes extracel·lulars per promoure la dissolució reductiva d'òxids fèrrics. El treball conclou que l'exsudació radicular de compostos de tipus cumarina en plantes de *A. thaliana* i de flavines en plantes de remolatxa, permet augmentar la concentració de Fe soluble en sòls amb baixa disponibilitat d'aquest nutrient i, per tant, millora la nutrició fèrrica d'aquestes espècies.

A remarkable metabolic feature of plant roots is the ability to secrete a vast array of compounds into the rhizosphere. The regulation of the synthesis and active secretion of these compounds allows their action to occur at the precise site and time required, enabling plants the ability to cope with changes in the local environment, thus avoiding possible adverse effects such as osmotic changes, pathogen attack, low nutrient supply, etc. A part of the secreted compounds are produced by the secondary metabolism, and their role in the regulation of the soil microbial community, the promotion of beneficial symbiotic associations and the inhibition of the growth of competing plant species has been extensively investigated. However, the influence of these compounds in rhizosphere nutrient availability has been less studied. The aim of this study was to investigate the root exudation of phenolic compounds and flavins induced by the deficiency of iron (Fe), an abundant but generally poorly soluble micronutrient in soils. Although these root responses have been reported in different non-graminaceous species for decades, the identity of the compounds, their transport outside the roots and their role in the rhizosphere are largely unknown. The study used the model plant species *Arabidopsis thaliana* and two crop species, tomato (*Solanum lycopersicum*) and sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*).

The present Thesis includes the first thorough and systematic analysis of the phenolic compounds and flavins accumulated and secreted by roots in response to Fe deficiency. The analytical approach used is based on the separation of the compounds by high performance liquid chromatography and their detection by a combination of fluorescence and UV-visible spectroscopy and different types of mass spectrometry. In *A. thaliana* and tomato, Fe deficiency induced the synthesis and accumulation of coumarin-type phenolic compounds and did not affect the root production of flavins. Conversely, sugar beet did not produce phenolic compounds in response to Fe deficiency, but instead synthesizes and accumulates flavins -mainly riboflavin sulfates- in roots, and also exports them to the growth medium. The time of Fe deficiency exposure and/or the pH of the culture medium affect the production of coumarins in *A. thaliana* and tomato, and the coumarin profile was different in both species. Although the two species produce simple coumarins with the oxygen-containing substituents hydroxyl, methoxyl and -O-hexosyl in the benzene ring, the number of such substituents was different. In tomato, tetra-oxygenated coumarins such as trihydroxymethoxycoumarin were predominant over the tri- and di-oxygenated coumarins (such as fraxetin and scopoletin, respectively), whereas *A. thaliana* produced only tri- and di-oxygenated coumarins, along with cleomiscosin-type coumarinolignans. The root coumarins were in hexoside and aglycone forms, with the prevalent form being dependent on the coumarin and/or the plant species. The coumarin profile of the culture medium differed from that found in roots: the coumarins were in the aglycone form, and the predominant ones were scopoletin and fraxetin. This Thesis revealed that the transporter AtABCG37 is involved in the secretion of coumarins in *A. thaliana*.

This study also showed that the depletion of coumarin-type phenolics and flavins in the culture medium of Fe-deficient *A. thaliana* and sugar beet plants, respectively, has a negative impact on the plant Fe nutritional status. The catechol coumarin fraxetin and the reduced forms of flavins promoted the dissolution of ferric oxide –the major form of Fe in soils- at agronomically relevant pH values. In addition, other results of this study provide support for the view that roots of Fe-deficient sugar beet plants can use endogenous extracellular flavins to dissolve ferric oxide. This Thesis concludes that the root secretion of coumarin-type compounds by *A. thaliana* and of flavins by sugar beet allows for increasing the concentration of soluble Fe in soils with low Fe availability, therefore improving the Fe nutritional status in these species.



Plant Stress Physiology



CSIC

Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària